

The Investigation of OdorContribution by sub-Threshold Odorants based on Measurement of Odor Interaction among Odors Mixture

著者	宮澤 利男
号	49
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農第770号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60272

みやざわ としお

氏 名（本 籍 地） 宮 澤 利 男

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農第 770 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 25 年 1 月 10 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項

論 文 題 目 The Investigation of OdorContribution by sub-Threshold Odorants based
on Measurement of Odor Interaction among Odors Mixture（食品に含まれ
るニオイ成分の相互作用計測による閾下濃度ニオイ成分の寄与に関する研究）

博士論文審査委員 （主査）教 授 駒 井 三千夫

教 授 藤 井 智 幸

准教授 都 築 毅

論文内容要旨

緒論

【ニオイの分析】

食品の機能として、「おいしさ」は重要な機能の一つである。この「おいしさ」は、香り・味・テクスチャー・温度・色などの多様な情報によって決定されるが、「おいしさ」は、「美味しさ」とも記載されるように、味覚の関与が大きいと思われがちである。しかし食事をすすめる際、鼻が詰まった状態では何を食べているのか判別できなくなることから、「おいしさ」にはニオイが、重要な役割を担っていることが認識できる。

食品のニオイは数百種を超える成分より構成されているが、このような多成分系であるニオイの特徴を捉える手法としては、総合的な判断が可能である嗅覚を用いた官能評価(心理計測)や、客観的な成分分析が可能な機器分析(理化学計測)が古くから利用されている(図1)。

近年、GC-MS(ガスクロマトグラフ-質量分析装置)とGC-O(ガスクロマトグラフィー-オルファクトメトリー)の進歩により、食品に含まれる何千ものニオイ成分が解明されてきた。GC-MSは多成分から成るニオイを個々の成分に分離することで、物質の定性および定量化が可能である。一方GC-O、正確には Aroma Extract Dilution Analysis(AEDA法)は、機器分析では検出できない微量成分に対して人間の鼻を検出器として用いることで、各成分のニオイ強度の測定が可能である(図2)。実際、食品中において含有量が少なくてもニオイ成分としては重要なものも多く、こういった特徴的なニオイ成分(香気寄与成分)を検索するのに適した手法である。

一方、これら機器によるアプローチは多成分から成るニオイを各成分に分離しているが故に、成分間の相互作用をみることが出来ないといった側面もある。そのため食品などのニオイの特徴を正確に捉えるには、一つ一つのニオイ成分の解明に加えて、成分間の相互作用を計測することが重要と考えられる。

【成分間の相互作用】

「相互作用」とは、混合状態において加法性が成り立たない状態を示し、少量の塩の添加で甘味が強くなるといった「隠し味」は、味覚における相互作用の一例である。しかし隠し味のメカニズムは依然解明されておらず、脳での対比効果や受容体の構造変化によって親和性が増すことなどが要因と考えられている。味の世界で最も顕著な相互作用は、グルタミン酸ナトリウムとイノシン酸ナトリウム間で起こる旨味の相乗効果である。

ニオイでは複数の香気成分を混合した場合、混合前後での加法性は成り立たず、相互作用による「混合抑制」つまりニオイ強度が抑制されることが心理学的に知られている。この現象は受容体での競合が可能性の一つとも言われており、ニオイ分子が飽和した状態ではニオイ成分同士での競合が起こるため物質間同等の効果が得られないといった仮説であるが、メカニズム詳細は不明である。最近の研究では、ニオイ成分同士が互いの受容体の活性をブロックする「アンタゴニズム」と呼ばれる現象、つまりこの「混合抑制」が起こるとき分子機構の一端が受容体レベルでも明らかにされてきた。

一方、心理物理学からの研究では、各構成成分間での相互作用の及ぼす影響度合いを客

観的に定量するために、応答加法モデル、濃度加法モデルといった心理物理モデルを用いた解析を行うことによって、「混合抑制」の定量化に成功した。具体的には、閾値以上（閾上）濃度成分同士の組合せにおいては、各構成成分の構造類似性に関係なく抑制効果を示すといったこれまで経験的に捉えられてきた「混合抑制」を立証するものであった。

しかし相互作用の検証には構成成分や濃度の組合せが無限大に考えられるため、多成分系において各構成成分がどのように寄与しているかの疑問に対する知見はあまり得られていない。特に閾値濃度付近における応答に着目した報告は少ない。そこで本研究では、閾値濃度付近におけるニオイ成分同士での相互作用を系統的に定量化することで、ニオイを構成する各成分がどういったニオイ寄与を示しているか確認することとした。

第一章. ニオイ測定値に影響を及ぼす官能評価条件の検証

【目的・方法】

ニオイ閾値やニオイ強度などの測定値は、評価手法や、被験者感度、評価条件に影響することが知られている。評価手法が複雑になるとデータ精度は高くなるが、評価手法に対するトレーニングや、被験者への記憶補助、感覚順応への対策などが必要とされている。しかし、多大な官能試験が必要なため、これらの官能評価条件が、ニオイ測定値にどのような影響を及ぼすかに関する知見は、定量的にあまり得られていない。

そこで本研究では、ニオイ測定値と官能評価条件の関係性を定量的に把握するために、以下条件における濃度応答曲線（濃度 vs. ニオイ識別率）を測定することとした。

- (1) サンプル提示手法 : 極限法（低濃度から高濃度サンプルの提示）、ランダム法
- (2) サンプル提示回数 : 1 回、複数回
- (3) サンプル提示間隔 : 15 秒、30 秒

(4) パネル条件 : ニオイ物質ならびに評価手法に対するトレーニング有、無
モデルのニオイ物質は、幅広い食品に含まれている脂肪族カルボン酸（acetic acid: C_2 ）を選定し、6段階（2.2倍希釈系列）の閾値付近濃度（閾下から閾上濃度）のニオイ刺激となるようにオルファクトメーター（図5）を用いて調整した。またニオイ閾値や濃度応答曲線の測定手法として、2AFC（ニオイ刺激1, ブランク1, 偶然確率50%）や3AFC（ニオイ刺激1, ブランク2: 偶然確率33%）などが一般的に用いられるが、精確なデータを測定するために、本研究では2/5識別法（ニオイ刺激2, ブランク3, 偶然確率10%, n:28, 繰返し12回）を用いることとした。

【結果・考察】

図3（右上）は、Stimulus order 条件（サンプル提示手法：極限法、ランダム法）違いにおける濃度応答曲線を示したものである。分散分析を実施したところ、 $F(1,26) = 7.38$, $p < 0.02$ であり、極限法とランダム法において有意な差異がみられ、また両者には3.46 倍の閾値差（表1）がみられた。図3（左上）は、Re-sampling 条件（サンプル提示回数：1 回、複数回）違いにおける濃度応答曲線を示したものである。分散分析を実施したところ、 $F(1,26) = 24.73$, $p < 0.0001$ であり、提示回数1 回と複数回において有意な差異がみられ、ま

た両者には 5.88 倍の閾値差 (表 1) がみられた。図 3 (左下) は、Inter-trial interval 条件 (サンプル提示間隔: 15 秒、30 秒) 違いにおける濃度応答曲線を示したものである。分散分析を実施したところ、 $F(1,26) = 2.50, p=0.13$ であり、サンプル提示間隔 15 秒と 30 秒において有意な差異はみられなかった。図 3 (右下) は、Practice 条件 (パネル条件: トレーニング有、無) 違いにおける濃度応答曲線を示したものである。分散分析を実施したところ、 $F(1,12) = 0.60, p=0.45$ であり、トレーニング有/無において有意な差異はみられなかった。

本研究で用いた評価手法 (2/5 識別法) は、2AFC や 3AFC と比較して、偶然確率が低い
ため精確なデータを算出することが可能な反面、評価手法が複雑なため手法に対する
トレーニングや、被験者への記憶 (どのサンプルがニオイを有していたかの記憶) 補助の
必要性がある。更にニオイ提示回数が多いため感覚順応の危険性が高いとされてきた。
しかし本研究の結果より、評価手法に対するトレーニングの有無ならびにサンプル
提示間隔は測定データに対して影響が少ないことが示された。一方、サンプル提示
手法ならびにサンプル提示回数は測定データに対して影響を及ぼすことが示され
たことから、感覚順応を軽減するには、サンプル提示手法として極限法を用いるこ
との必要性、また複雑な評価手法による誤差を軽減するには、サンプル提示を複
数回行うことの必要性が示唆された。今後これらの条件を留意することで、これ
まで以上に精確なニオイ測定値を得ることが可能と考えられる。

第二章. 閾値付近濃度における類似構造間でのニオイ相互作用の計測

～炭素鎖長の異なる脂肪族カルボン酸を用いた二成分混合系～

【目的・方法】

これまでのニオイ成分間での相互作用に関する報告では、閾値付近濃度における
混合物の応答は、心理物理モデルのうち応答加法モデル (response-addition: 混合
物の各構成成分による応答が独立していると仮定) と一致、一方、閾上濃度にお
ける混合物の応答は濃度加法モデル (dose-addition: 混合物の構成成分による
応答が等価的であると仮定) と一致していた (図 4)。これらの現象は、各構成成
分の構造類似性に関わらず観察されていた。

そこで本研究では、従来検証がなされていない閾値以下 (閾下) 濃度域での
相互作用の定量化を行うために、特に炭素鎖長に着目し、系統的に炭素鎖長が
異なる脂肪族カルボン酸 (acetic acid: C_2 , butyric acid: C_4 , hexanoic acid: C_6 ,
octanoic acid: C_8) を用いて、6 段階 (2.2 倍希釈系列) の閾値付近濃度
(閾下から閾上濃度) のニオイ刺激となるように単一系と二成分混合系
(C_2+C_4 , C_2+C_6 , C_2+C_8) を調整し、単一系と二成分混合系の閾値付近
濃度における応答 (ニオイ識別率) を官能評価により測定することで、ニオイ
応答に対する各構成成分間の相互作用の及ぼす影響度合いを評価することとし
た。なお精確な相互作用の定量化を実現するために、化学的な相互作用を最大
限排除する目的で開発したオルファクトメーター (図 5) を利用し、また評価
手法は先行研究 (一章) により適しているとされた 2/5 識別法 (n:20, 繰返し
12 回) とした。また各化合物の濃度は、単一成分および混合物に関わらず同
濃度に調整されていることをヘッドスペース固相マイクロ抽出法とガスクロ
マトグラフ質量分析計を用いて確認した (図 6)。

【結果・考察】

図 7 は、混合物を構成する単一成分 (C_2 , C_4 , C_6 , C_8) の濃度応答曲線を示したものである。なお実験データの再現性および訓練効果の有無を確認する目的で、単一成分 (C_2 , C_4) に関して再度測定を行った結果 (図 8)、統計的に有意な差は見られなかった。図 9 は、混合物 (C_2+C_4 , C_2+C_6 , C_2+C_8) の濃度応答曲線 (実測値) と、また測定した単一成分のデータを用いて、混合状態でのニオイ識別率の予測値を 2 つの心理物理モデル (応答加法モデル、濃度加法モデル) を適用し算出したものである。

測定結果に対して、多変量分散分析を実施したところ、 C_2+C_4 vs. C_2+C_6 , $F(5,14)=2.87$, $p=.05$, C_2+C_4 vs. C_2+C_8 , $F(5,14)=3.71$, $p<.03$, C_2+C_6 vs. C_2+C_8 , $F(5,14)=0.24$, $p>.50$ であった。この結果より C_2+C_4 と C_2+C_6 , C_2+C_8 の組合せでは異なる相互作用パターンであることが有意に示された。一方、 C_2+C_6 , C_2+C_8 は閾下濃度では応答加法モデルに、閾上濃度では濃度加法モデルに一致していた。これらの結果はこれまでの報告と同様に閾上濃度での「混合抑制」を示すものであった。一方 C_2+C_4 の組合せは、閾下濃度では濃度加法モデルと一致していたが、閾上濃度では濃度加法および応答加法モデルにも一致せず、 C_2+C_6 , C_2+C_8 および過去の報告とは異なる傾向であった。つまり C_2+C_4 の組合せは、閾下濃度では正の相互作用 (相乗効果)、閾上濃度では負の相互作用 (抑制効果) が生じたことが統計的に有意に認められた (図 10)。

これらの結果より相互作用は、混合物を構成する各成分の濃度に依存し、更には炭素数もしくは分子量の類似した構造間において生じる可能性が高いことが示唆された。またニオイとして知覚できない閾下濃度域の脂肪族カルボン酸が、相互作用によりニオイ寄与を示すことを示唆するものであった。

第三章. 閾値付近濃度における非類似構造間でのニオイ相互作用の計測

～脂肪族カルボン酸とコーヒー香気成分を用いた二成分混合系～

【目的・方法】

先行研究 (二章) では、二成分混合系と単一系でのニオイ識別率の差に着目し、系統的に炭素鎖長が異なる化合物を用いて、相互作用の及ぼす影響度を定量化したところ、炭素数もしくは分子量の類似した構造間において、相互作用が生じること、更に閾下濃度では相乗効果を示すことが示唆された。

そこで本研究では、構造が異なる化合物との組合せにおいても相互作用が同様に観察されるか検証するために、図 11 記載のコーヒー香気成分 (3-methyl-3-sulfanylbutyl acetate: ASC, furfuryl mercaptan: FM, maple lactone: ML) と幅広い食品中に含まれる脂肪族カルボン酸 (C_2 , C_4 , C_6 , C_8) を用いて、6 段階 (2.2 倍希釈系列) の閾値付近濃度 (閾下から閾上濃度) のニオイ刺激となるように単一系と二成分混合系 (C_2+ASC , C_4+ASC , C_6+ASC , C_8+ASC , C_2+FM , C_4+FM , C_6+FM , C_8+FM , C_2+ML , C_4+ML , C_6+ML , C_8+ML) を調整し、単一系と二成分混合系の閾値付近濃度における応答 (ニオイ識別率) を官能評価 (2/5 識別法, $n:12$, 繰返し 12 回) によって測定することで、ニオイ応答に対する各構成成分間の相互作

用の及ぼす影響度合いを評価することとした。なお各化合物の濃度は、単一成分および混合物に関わらず同濃度に調整した。

【結果・考察】

図 12 は、混合物 (C_2+ASC , C_4+ASC , C_6+ASC , C_8+ASC , C_2+FM , C_4+FM , C_6+FM , C_8+FM , C_2+ML , C_4+ML , C_6+ML , and C_8+ML) に対する濃度応答曲線 (実測値) と、対照として、応答加法モデルによる濃度応答曲線 (予測値: 測定した単一成分のデータを用いて算出) を示したものである。測定結果に対して分散分析を実施したところ、 C_2+ASC では、 $F(4,44) = 4.28$, $p=0.005$ 、 C_4+ASC では、 $F(4,44) = 3.80$, $p=0.01$ 、 C_2+FM では、 $F(4,44) = 6.89$, $p=0.0002$ 、そして C_4+FM では、 $F(4,44) = 3.22$, $p=0.021$ であり、 C_2+ASC , C_4+ASC , C_2+FM , C_4+FM の組合せでは、閾下濃度では相乗効果、閾上濃度では抑制効果がみられた。また C_6+ML では、 $F(1,11) = 5.16$, $p=0.04$ 、 C_8+ASC では、 $F(1,11) = 6.31$, $p=0.03$ であり、 C_6+ML と C_8+ASC の組合せでは、実測値は予測値を下回る、つまり抑制効果がみられた。一方、他の組合せでは、実測値と予測値において差異はみられず、相加効果であることが示された。

このように構造が異なる化合物同士の組合せ (C_2+ASC , C_4+ASC , C_2+FM , C_4+FM) においても、有意な相互作用が観察され、ASC と FM は短鎖脂肪酸 (C_2 , C_4) との組合せで、類似した相互作用パターンを示す傾向がみられた。一方 ML と短鎖脂肪酸 (C_2 , C_4) との組合せでは、類似した傾向はみられなかった。また短鎖脂肪酸 (C_2 , C_4) は中鎖脂肪酸 (C_6 , C_8) と比較して、強く相互作用を示し、更には閾下濃度において相乗効果を示す傾向がみられた。このことは、閾下濃度の短鎖脂肪酸 (C_2 , C_4) が相乗効果を示した先行研究 (二章) と同様の傾向を示すものであった。

これらの結果より相互作用は、構造が異なる化合物同士の組合せにおいても観察される可能性が高いことが示唆された。また閾下濃度の短鎖脂肪酸 (C_2 , C_4) が相互作用によりニオイ寄与を示す可能性が高いことも示唆された。一方、電気生理学的手法や光学測定法を用いた末梢部や嗅球でのニューロン応答に関する研究では、共通の分子構造をもった一連のニオイ分子群にのみ嗅球が選択的に応答するとの報告があり、今回の結果との共通性もみられた。

第四章. 閾下濃度の脂肪族カルボン酸存在下でのニオイ識別率の測定

【目的・方法】

先行研究 (二,三章) により、ニオイとして知覚できない閾下濃度域の脂肪族カルボン酸は、相互作用によりニオイ寄与を示すことが示唆されたが、閾下濃度域の成分が食品全体のニオイ強度や質にどのような影響を与えるかの疑問に対する知見は依然少ない。

そこで本研究では、閾下濃度の脂肪族カルボン酸 (C_2 , C_4) が、どの濃度域でニオイ寄与を示すか確認するため、コーヒー香気成分の一つである ML をモデル化合物として、二成分混合系 (閾下から閾上濃度のコーヒー香気成分 + 閾下濃度の脂肪族カルボン酸) における相互作用を官能評価により定量化することとした。ML の濃度はオルファクトメーター (図 5) を用いて、6 段階 (2.2 倍希釈系列) の閾値付近濃度 (閾下から閾上濃度) に調

整し、閾下濃度の脂肪族カルボン酸の存在有無における ML の濃度応答曲線（濃度 vs. ニオイ識別率）を官能評価（2/5 識別法, n:17, 繰返し 12 回）によって測定した。なおニオイ閾値は被験者の感度によって異なるため、 C_2 、 C_4 の閾値は被験者毎に事前に算出し調整することとした。

【結果・考察】

図 13 は、閾下濃度の脂肪族カルボン酸（ C_2 もしくは C_4 ）の存在下における ML の濃度応答曲線と、対照として ML 単独の濃度応答曲線を示したものである。 C_2 、 C_4 の濃度は被験者毎に調整するために測定した各被験者の閾値より 1 ないし 2 段階低い濃度（-1,-2）で一定に保ち、また ML は脂肪族カルボン酸の濃度に関わらず 6 段階（2.2 倍希釈系列）の閾値付近濃度に先のオルファクトメーターによって調整した。

測定結果に対して分散分析を実施したところ、 C_2 では、 $F(2,32) = 22.19, p < .001$ 、 C_4 では、 $F(2,32) = 106.41, p < .001$ であり、閾下濃度の脂肪族カルボン酸（ C_2 、 C_4 ）の存在下と非存在下では、識別傾向に違いがあることがわかった。しかし脂肪族カルボン酸の濃度差による差異は C_2 、 C_4 どちらにも見られなかった。更に閾下濃度の脂肪族カルボン酸（ C_2 、 C_4 ）存在下での ML のニオイ識別率の実測値と応答加法モデルによる予測値を算出し、分散分析を実施したところ、 C_2 では、 $F(1,16) = 17.38, p < .01$ 、 C_4 では、 $F(1,16) = 43.87, p < .01$ であり、閾下濃度の脂肪族カルボン酸（ C_2 、 C_4 ）存在下での ML のニオイ識別率の予測値と実測値には違いがあることがわかった。また最も低い濃度を除いて、ML のニオイ識別率の実測値は予測値を上回っていた（図 14）。

これらの結果より、閾下濃度の脂肪族カルボン酸の添加によって、ニオイ識別率を増加させる作用を示し、更には相互作用により相乗効果を示したと考えられる。このことはニオイとして知覚できない閾下濃度域の成分が、相互作用によって他の香気成分のニオイ識別率に影響を及ぼすことを示唆するものであった。

第五章. 閾下濃度の脂肪族カルボン酸存在下でのニオイ強度の測定

【目的・方法】

先行研究（四章）では、閾下濃度の脂肪族カルボン酸（ C_2 、 C_4 ）が、ニオイ識別率に対して、どのような影響を与えるか確認したところ、閾下濃度成分の存在下においてニオイ識別率が増加した。このことはニオイとして知覚できない成分が、相互作用によって他の香気成分のニオイ強度に影響を及ぼすことを示唆するものであった。

そこで本研究では、閾下濃度成分によるニオイ寄与が、①他の化合物に対しても同様に観察されるか、②ニオイ強度の変化はどの程度かを検証するために、閾下濃度成分の存在有無における各種コーヒー香気成分のニオイ強度の変化を官能評価により定量化することとした。

図 11 記載のコーヒー香気成分（ASC, FM, ML）のニオイ強度は、Labeled Magnitude Scale において“moderate”から“strong”のニオイ刺激となるように、また脂肪族カルボン酸（ C_2 、 C_4 ）は、11 段階濃度（1.5 倍希釈系列）のニオイ刺激となるようにオルファクトメーター

(図 15) を用いて調整した。調整された気流中の物質濃度を、ヘッドスペース固相マイクロ抽出法とガスクロマトグラフ質量分析計にて分析した結果、閾上濃度に設定されたコーヒー香気成分は、ASC : 1.90×10^{-5} ppm、FM : 5.89×10^{-6} ppm、ML : 2.43×10^{-4} ppm、一方、11 段階濃度に調整された脂肪族カルボン酸は、C₂ : 3.65×10^{-2} ppm ~ 5.50×10^{-4} ppm、C₄ : 1.84×10^{-3} ppm ~ 0.20×10^{-4} ppm であった。

閾上濃度に調整された各コーヒー香気成分に対して、脂肪族カルボン酸が各被験者の閾下濃度（閾値の 2 段階下濃度：-2、閾値の 1 段階下濃度：-1）のニオイ刺激（例：ASC+C₂ (-2), ASC+C₂ (-1)）となるように先のオルファクトメーターにて調整し、そのニオイ強度を Labeled Magnitude Scale (n:15, 繰返し 8 回) にて測定した。なお脂肪族カルボン酸のニオイ閾値は、二者択一強制調整法 (2AFC) を用いて被験者毎に事前に測定を行った。

【結果・考察】

図 16 は、閾下濃度の脂肪族カルボン酸 (C₂) の存在下 (-1, -2) における各コーヒー香気成分 (ASC, FM, ML) のニオイ強度と、対照としてのコーヒー香気成分単独でのニオイ強度を示したものである。閾下濃度成分の存在有無での分散分析を実施したところ、ASC では、 $F(2,13) = 4.04$, $p < 0.05$ 、FM では、 $F(2,13) = 8.83$, $p < 0.01$ 、そして ML では、 $F(2,10) = 10.14$, $p < 0.01$ であった。また閾下濃度成分の濃度違い (-1, -2) での差異を t-tests (Bonferroni adjust alpha) にて確認したところ、ASC+C₂ (-2) では、 $t(14) = 2.87$, $p < 0.0125$ 、FM+C₂ (-2) では、 $t(14) = 4.16$, $p < 0.001$ 、そして ML+C₂ (-2) では、 $t(11) = 4.39$, $p < 0.01$ であった。このことから明らかなように、閾下濃度の C₂ 存在下（特に閾値の 2 段階下濃度：-2）では、各コーヒー香気のニオイ強度は有意に強められていることがわかった。

一方、上記と同様に閾下濃度の脂肪族カルボン酸 (C₄) の存在有無での各コーヒー香気成分のニオイ強度を測定し、分散分析を実施したところ、ML では、 $F(2,13) = 9.71$, $p < 0.01$ であったが、FM および ASC では、ともに $p > 0.10$ であり、閾下濃度の C₄ の存在によって、ニオイ強度の増強効果がみられたコーヒー香気成分は ML のみであった。

本研究では、先行研究（四章）と同様に閾下濃度の脂肪族カルボン酸の存在下においてコーヒー香気成分のニオイ強度が増強された。この結果は閾下濃度成分と閾上濃度成分における相互作用が観察されることを示唆するものであり、「閾下濃度成分」の重要性を認識させるものであると考えられた。

第六章. 閾値付近濃度における類似/非類似構造間でのニオイ相互作用の計測

～脂肪族カルボン酸とコーヒー香気成分を用いた三成分混合系～

【目的・方法】

先行研究（二,三章）では、二成分混合系に着目して相互作用を定量化したところ、混合物の構成成分の構造類似性や成分濃度が相互作用の質や強度に影響することが示唆された。

そこで本研究では、混合物を構成する成分数が増えた場合においても、相互作用が同様に観察されるか確認するために、三成分混合系（成分 A+B+C、成分 A+B+D、成分 A+B+E；構成成分の一種を変えた混合物）を 6 段階（2.2 倍希釈系列）の閾値付近濃度（閾

下から閾上濃度)に調整し、単一系と三成分混合系の閾値付近濃度における応答(ニオイ識別率)を官能評価(2/5 識別法, n:12, 繰返し 12 回)によって測定することで、ニオイ応答に対する各構成成分間の相互作用の及ぼす影響度合いを評価することとした。なお各化合物の濃度は、単一成分および混合物に関わらず同濃度に調整した。

【結果・考察】

図 17 は、単一成分 (C_2 , C_4 , C_6 , C_8 , ML) および混合物 ($C_2+C_4+C_6$, $C_2+C_4+C_8$, C_2+C_4+ML) に対する濃度応答曲線を示したものである。単一成分と混合物において差異があるか確認するため、分散分析を実施したところ、 $C_2+C_4+C_6$ と C_2, C_4, C_6 では $F(1,11) = 42.32, p < .001$, $F(1,11) = 7.61, p < .02$, $F(1,11) = 38.27, p < .001$ 、 C_2+C_4+ML と C_2, C_4, ML では $F(1,11) = 71.22, p < .001$, $F(1,11) = 11.60, p < .01$, $F(1,11) = 21.06, p < .001$ であり、単一成分と混合物において差異がそれぞれみられた。一方 $C_2+C_4+C_8$ と C_2, C_4, C_8 では $F(1,11) = 4.58, p < .06$, $F(1,11) = 4.55, p < .06$, $F(1,11) = 4.46, p < .06$ であり、単一成分と混合物において差異はみられなかった。また単一成分と混合物における識別傾向の差異を確認したところ、有意な差異がみられた条件は ML と C_2+C_4+ML の組合せのみであった ($F(5,7) = 5.26, p < .02$)。図 18 は、混合物 ($C_2+C_4+C_6$, $C_2+C_4+C_8$, C_2+C_4+ML) に対する濃度応答曲線(実測値)と、対照として、単一成分のデータを用いて応答加法モデルによって算出した濃度応答曲線(予測値)を示したものである。識別傾向にどのような差異があるか確認するため、多変量分散分析を実施したところ、 $F(2,10) = 4.25, p < .05$ であり、この結果から混合物の組合せにおいて識別傾向に違いがあることがわかった。また $C_2+C_4+C_6$ では $p > .30$ 、 C_2+C_4+ML では $p > .37$ であり、この結果から $C_2+C_4+C_6$ と C_2+C_4+ML では実測値と予測値において差異はみられず、相加効果であったことが示された。一方 $C_2+C_4+C_8$ では、 $F(1,11) = 12.55, p < .01$ であり、実測値と予測値において差異がみられ、 $C_2+C_4+C_8$ の実測値は予測値を下回る、つまり抑制効果がみられた。

これらの結果より、成分数が多くまた複雑な混合状態になると、相互作用はある規則性に合致した場合にのみ生じる可能性があることが示唆された。また相互作用の規則性を推測するために、単一成分と混合物における識別傾向の差異を確認したところ、有意な差異が唯一みられた条件 (ML と C_2+C_4+ML) は、本研究において、構造類似性が最も異なる組合せであることから、混合物を構成する成分の構造類似性が低いほど相互作用が強くなることが示唆された。

総括

本研究では、多成分なニオイ成分により構成される食品のニオイ特徴を正確に把握することを目的として、二成分および三成分混合系を用いて閾値濃度付近におけるニオイ相互作用を系統的に定量化することで、ニオイを構成する各成分がどういったニオイ寄与を有しているか検討した。これらの検討結果から以下の知見が得られた。

1) 類似構造間での相互作用を定量化したところ、混合物を構成する成分の構造類似性（炭素数もしくは分子量の類似性）や成分濃度が相互作用に影響することが明らかになった。また閾下濃度域で相乗効果、閾上濃度域で抑制効果が確認された。

2) 非類似構造間での相互作用を定量化したところ、非類似構造間においても相互作用が生じることが明らかになった。また閾下濃度の短鎖脂肪酸による相乗効果が確認された。

3) 閾下濃度の短鎖脂肪酸の存在下において、ニオイ識別率およびニオイ強度の増加効果が相乗的であることが確認された。このことからニオイとして知覚できない成分が、相互作用によって他の香気成分にニオイ寄与を及ぼすことが考えられた。またこの相互作用に化合物依存性は確認されなかった。

4) 三成分混合系での相互作用を定量化したところ、相互作用はある規則性に合致した場合にのみ生じることが示唆された。また混合物を構成する成分の構造類似性が低いほど相互作用が生じることが考えられた。

嗅覚で受容されるニオイは単一成分ではなく多成分であり、例えば食品のニオイは、数百種を超える成分から構成されている。しかし私たちは一つ一つのニオイ成分を嗅ぎ分けるのではなく、トータルのニオイとして捉えているのである。つまり複数の成分が互いに相互作用することで形成された全体を捉えている。それ故ニオイの本質を理解するには、既知成分のみでは説明がつかないこともあり、相互作用を把握しなければならないといえる。しかし相互作用の検証には莫大な時間を要するため知見が少ないのも現状である。

本研究で示した一連の「ニオイ成分間での相互作用」は、ニオイ成分同士の関わりの中の一部であるが、ニオイとして知覚出来ない閾下濃度成分が、相互作用によりニオイ寄与を示すといった仮説を裏付けるものであり、ニオイを解明する上での重要な知見の一つと考えられる。

知覚は感覚を基礎におくため実際に私たちが感じていなくても、その影響を受けることは理に適っている。そのため複数成分で構成されるニオイの中での「閾下濃度成分（隠し香）の存在意義」がますます解明されると思われる。しかし相互作用のメカニズム解明に向けて、今後より広範な化合物、かつ多成分系といった複雑な実験デザインでの検証が必要である。またこのような心理物理学からの相互作用の解明だけでなく、生物学分野（生理計測）や理化学分野（理化学的計測）など様々な研究分野による研究成果の相互作用も

必要である。そこで、次なるステップとして、生理計測の側面から閾下濃度成分による食品のニオイに対する寄与の検証を進めることでメカニズムの解明に迫りたい。

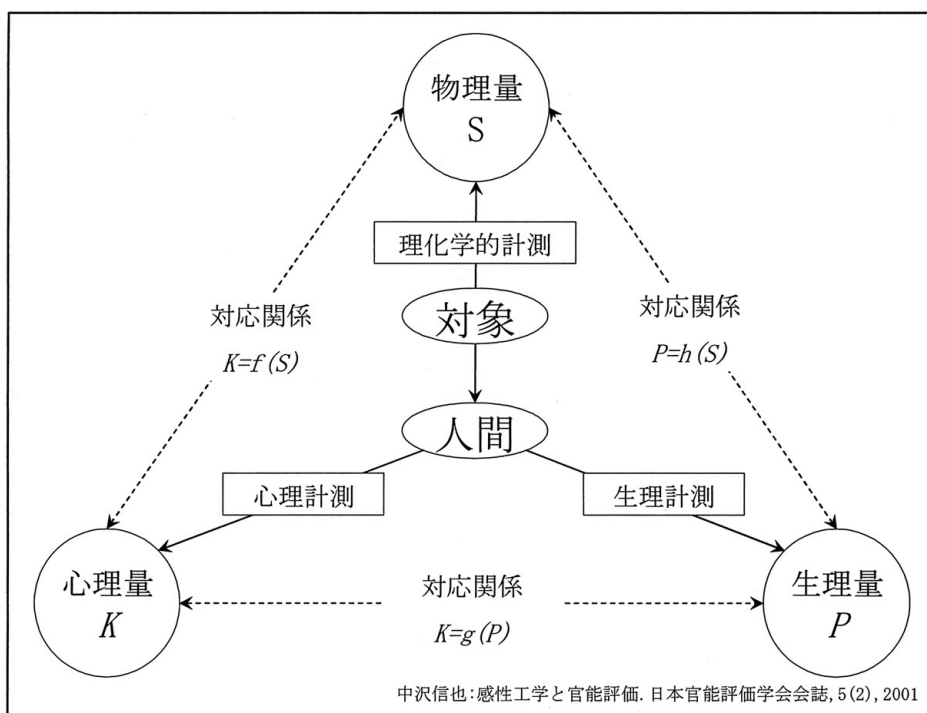


図1 ニオイの計測

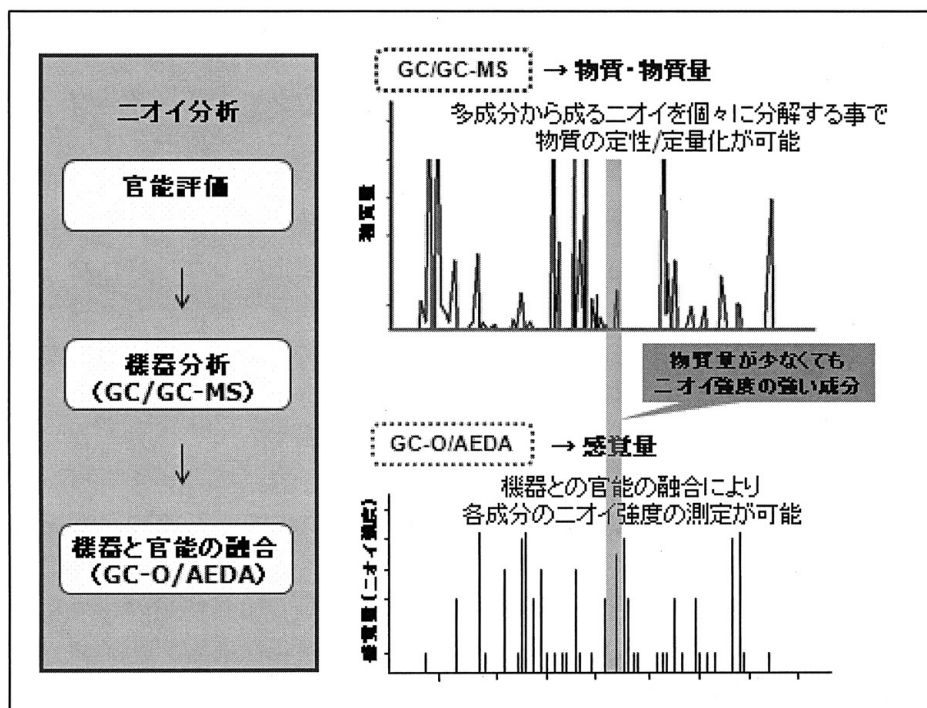


図2 ニオイ分析のアプローチ

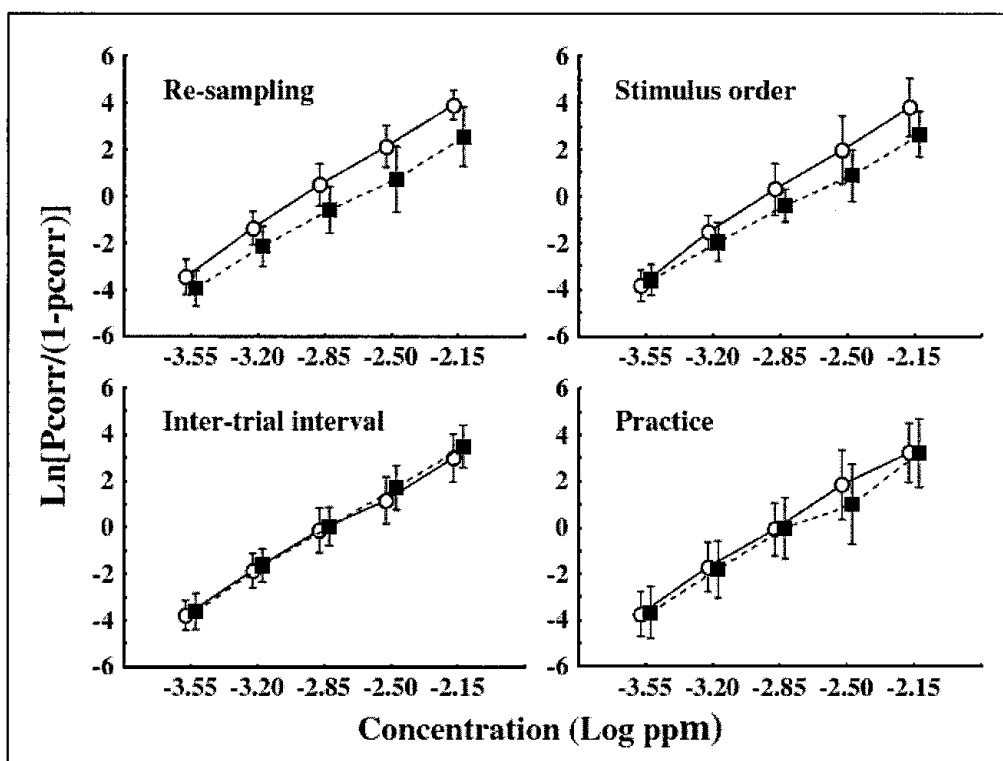


図3 各種評価条件における濃度応答曲線（縦軸：ニオイ識別率、横軸：ニオイ刺激の濃度）
 右上：サンプル提示手法（実線：極限法、点線：ランダム法）
 左上：サンプル提示回数（実線：複数回、点線：1回）
 左下：サンプル提示間隔（実線：30秒、点線：15秒）
 右下：パネル条件（実線：トレーニング有、点線：トレーニング無）

表1 各種評価条件におけるニオイ閾値（log ppm）

	Experimental condition	Threshold	Ratio
(1)	Random order	-2.85	3.46
	Blocked ascending order	-3.39	
(2)	Resampling not allowed	-2.73	5.88
	Resampling allowed	-3.50	
(3)	15 s ITI	-3.12	0.91
	30 s ITI	-3.08	
(4)	Unpracticed subjects	-2.97	1.79
	Practiced subjects	-3.23	

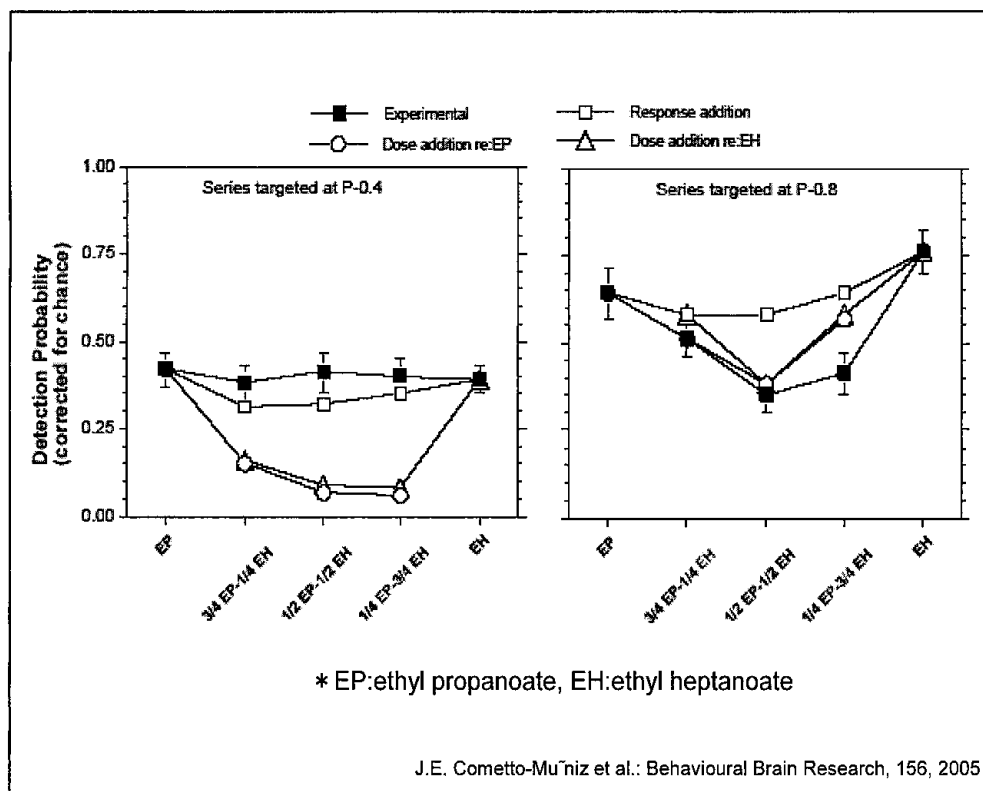


図 4 心理物理モデルによる相互作用の解析 (縦軸：識別率、横軸：混合物の混合比率)

■：実測値、□：応答加法モデル、○：E Pに基づく濃度応答モデル

△：E Hに基づく濃度応答モデル

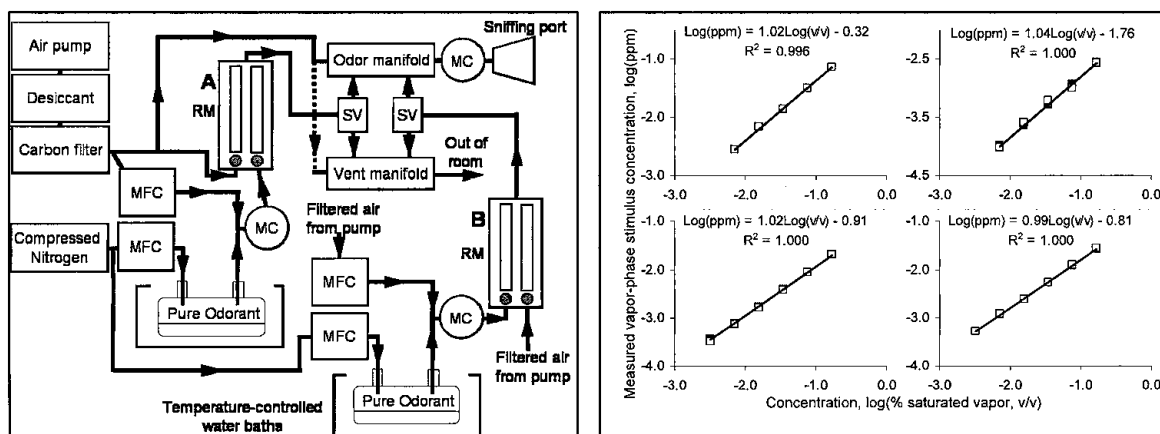


図 5 (左) オルファクトメーター

MC=ミキシングチャンバー, MFC=マスフローコントローラ, RM=流量計, SV=電磁バルブ

図 6 (右) オルファクトメーターの検量 (縦軸：分析値、横軸：計算値)

□：単一成分、■：混合物中の対象の化合物

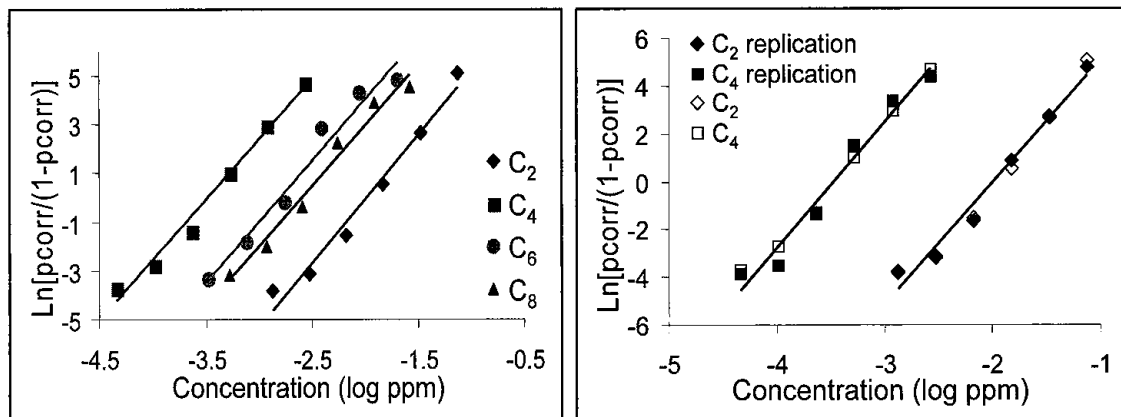


図 7 (左) 単一成分の濃度応答曲線 (縦軸：識別率、横軸：単一成分の濃度)

$$C_2: \log \text{ odds (pcorr)} = 5.25 \log(\text{ppm}) + 10.46, r^2 = .98$$

$$C_4: \log \text{ odds (pcorr)} = 5.00 \log(\text{ppm}) + 17.41, r^2 = .99$$

$$C_6: \log \text{ odds (pcorr)} = 5.00 \log(\text{ppm}) + 14.00, r^2 = .97$$

$$C_8: \log \text{ odds (pcorr)} = 4.98 \log(\text{ppm}) + 12.92, r^2 = .98$$

図 8 (右) C_2 、 C_4 の濃度度応答曲線 (縦軸：識別率、横軸：単一成分の濃度)

$$C_2: \log \text{ odds (pcorr)} = 5.14 \log(\text{ppm}) + 10.23, r^2 = .98$$

$$C_4: \log \text{ odds (pcorr)} = 5.26 \log(\text{ppm}) + 18.28, r^2 = .97$$

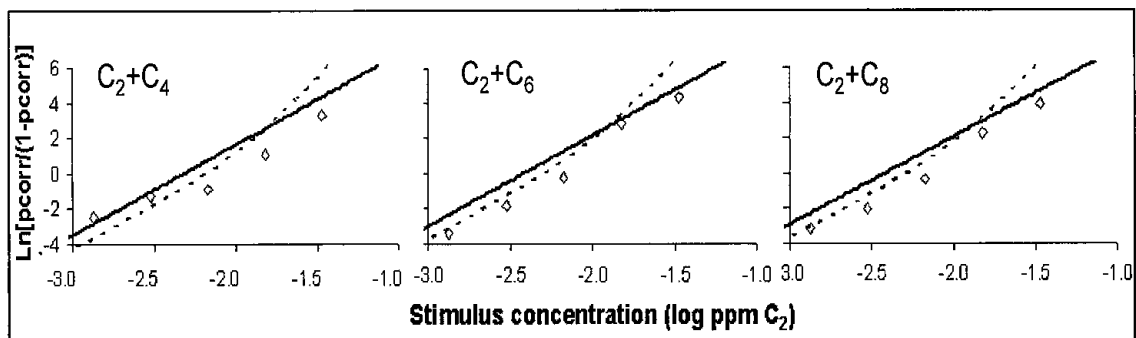


図 9 混合物の濃度応答曲線 (縦軸：識別率、横軸：混合物中における C_2 濃度)

点線：応答加法モデルに基づく予測値

実線：濃度加法モデルに基づく予測値

◇：実測値

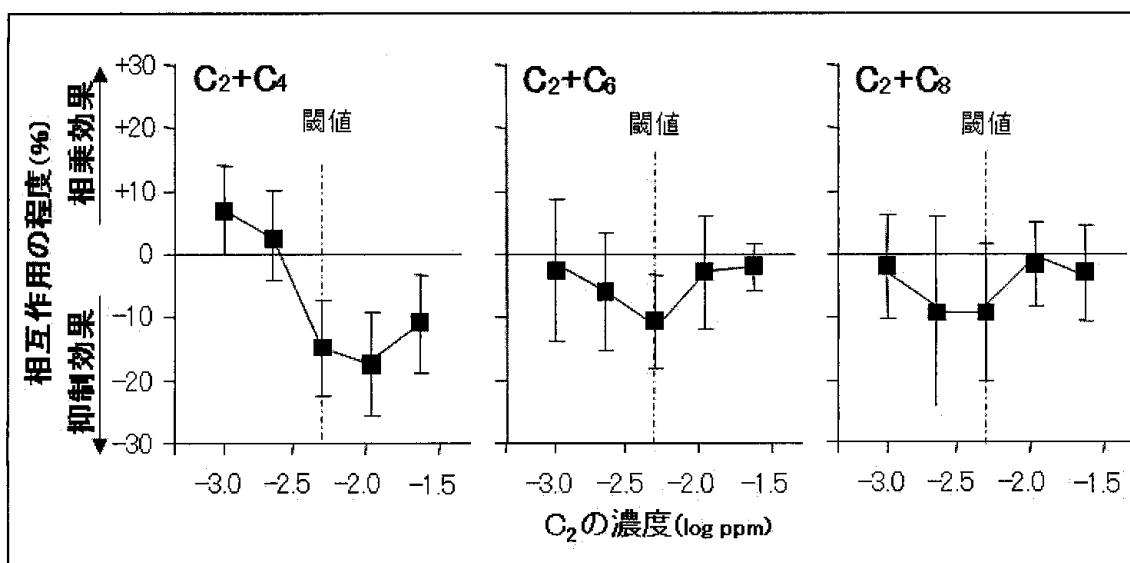


図 10 実測値と予測値の比較

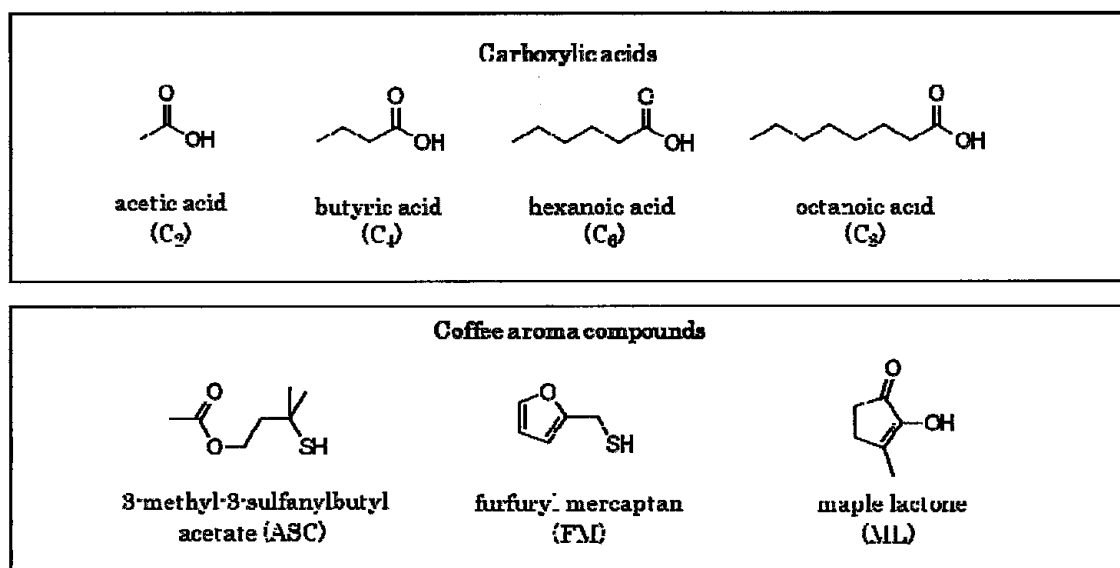


図 11 ニオイ物質の化学構造

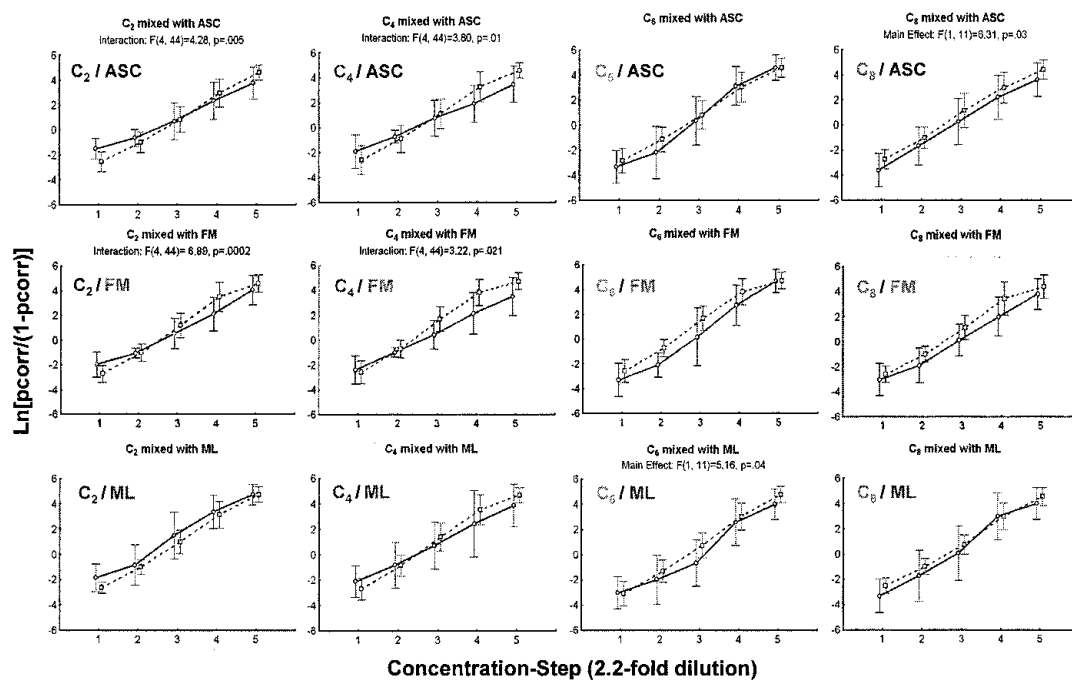


図 12 混合物の濃度応答曲線（縦軸：混合物の識別率、横軸：混合物の段階希釈濃度）
実線：実測値、点線：応答加法モデルに基づく予測値

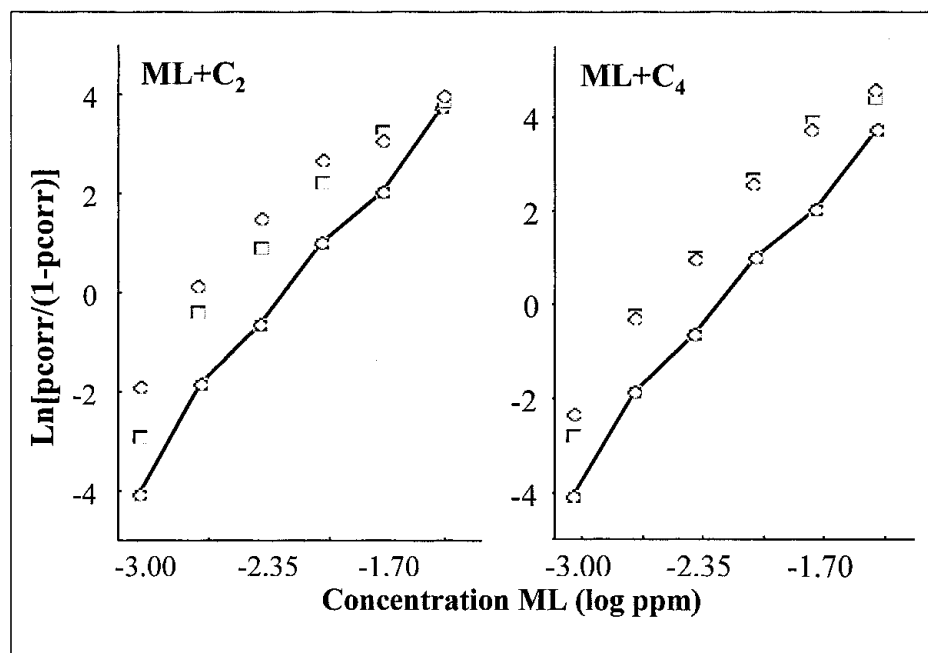


図 13 閾下濃度成分の存在下、非存在下での濃度応答曲線（縦軸：識別率、横軸：ML 濃度）
実線：ML 単独の濃度応答曲線（対照）
◇：閾値より 1 段階低い濃度の脂肪酸存在下での ML の濃度応答曲線
□：閾値より 2 段階低い濃度の脂肪酸存在下での ML の濃度応答曲線

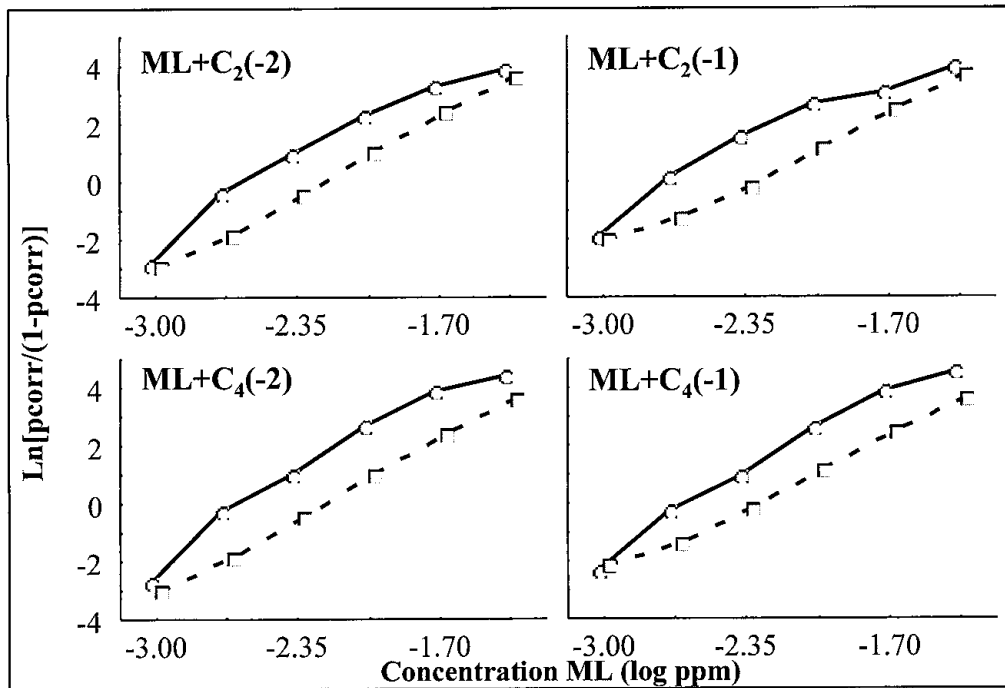


図 14 混合物の濃度応答曲線（縦軸：識別率、横軸：ML 濃度）
 実線/●：実測値、点線/□：応答加法モデルに基づく予測値

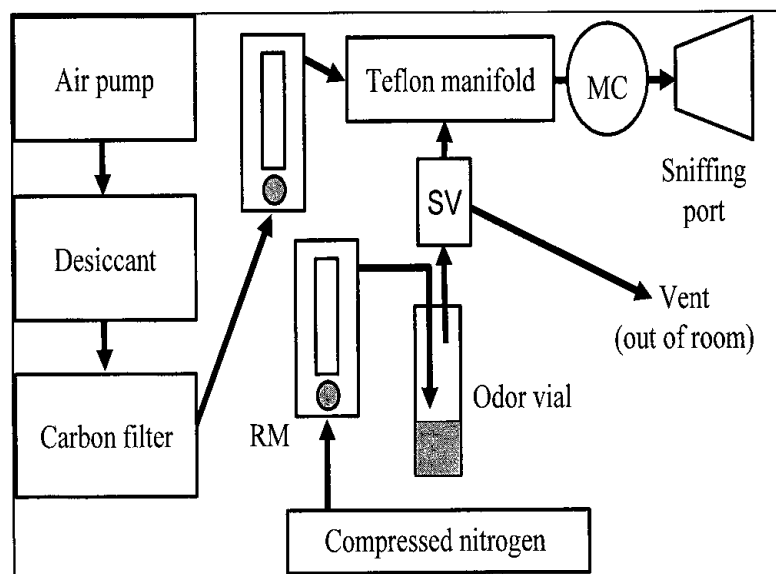


図 15 オルファクトメーター
 MC=ミキシングチャンバー, RM=流量計, SV=3 弁式電磁バルブ

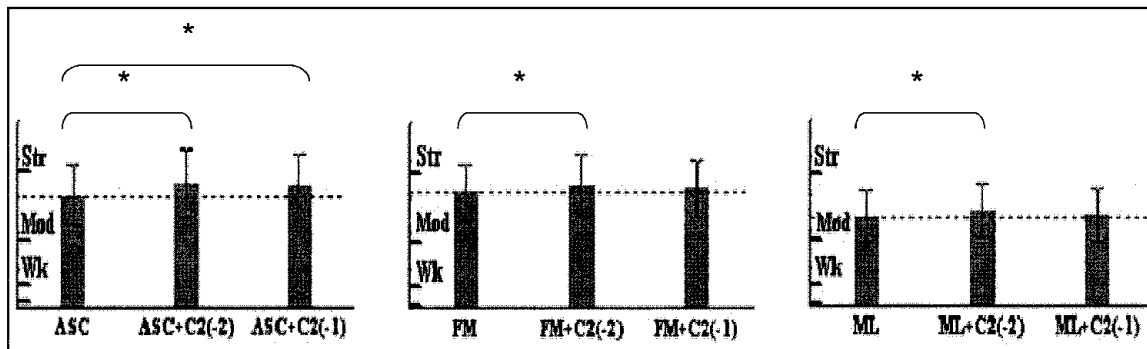


図 16 閾下濃度成分 (C₂) の存在下、非存在下でのコーヒー香気のニオイ強度

縦軸：ニオイ強度 (Wk = “weak”, Mod = “moderate”, Str = “strong”)

有意水準 (* : $\alpha=0.05$, ** : $\alpha=0.01$, *** : $\alpha=0.001$)

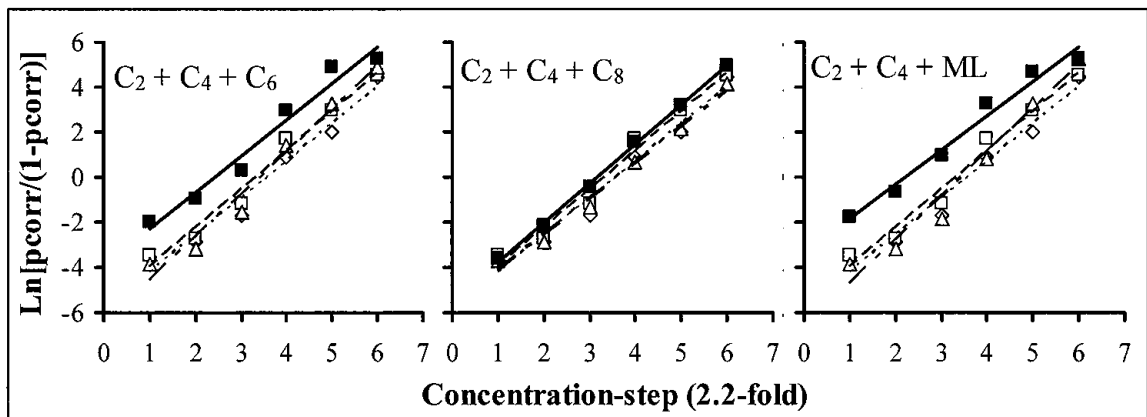


図 17 単一成分と混合物の濃度応答曲線 (縦軸：識別率、横軸：段階希釈濃度)

単一成分 (C₂: 点線/◇、C₄: 点線/□、第 3 の化合物: 点線/△)、混合物: 実線/■

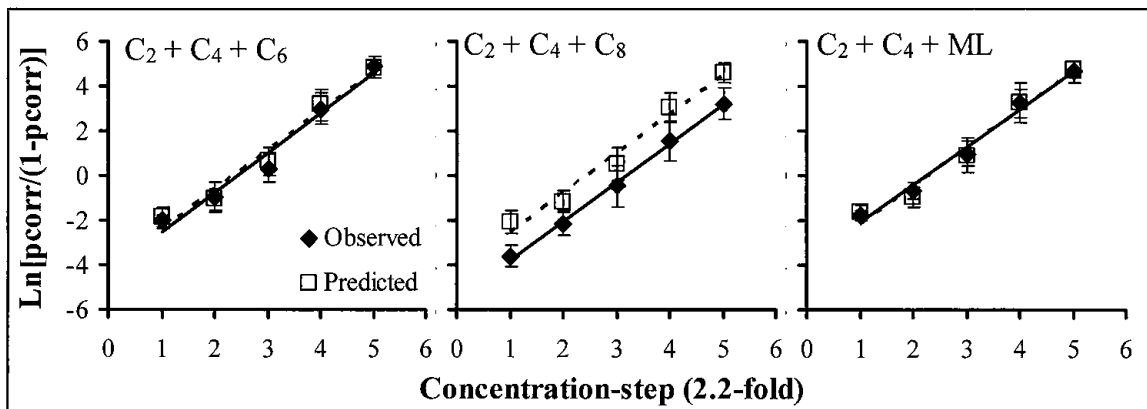


図 18 混合物の濃度応答曲線 (縦軸：識別率、横軸：段階希釈濃度)

実線/◆：実測値、点線/□：応答加法モデルに基づく予測値

論文審査結果要旨

本研究では、多成分なニオイ成分により構成される食品のニオイ特徴を正確に把握することを目的として、二成分および三成分混合系を用いて閾値濃度付近におけるニオイ相互作用を系統的に定量化することで、ニオイを構成する成分がどういったニオイ寄与を示しているかを解明しようとした。

そこで従来検証がなされていない閾下濃度域での相互作用の定量化を行うために、単一系と二成分ないし三成分混合系の閾値付近濃度における応答（ニオイ識別率）を官能評価（2/5 識別法）により測定することで、ニオイ応答に対する各構成成分間の相互作用の及ぼす影響度合いを評価した。その際に、これまでの嗅覚風味計測では難しかった精確な相互作用の定量化を実現するための計測系の改良を先ず行った。すなわち、化学的な相互作用を最大限排除する目的で、新規にオルファクトメーターを開発した。これによって、各化合物の濃度は、単一成分および混合物に関わらず同濃度に調整されていることを、ヘッドスペース固相マイクロ抽出法とガスクロマトグラフ質量分析計を用いて確認し、新しく確立した計測系の精度が十分に高いことを確認した。

以上のような手法で検討した結果、次の1)～4)の新しい知見が得られた。

- 1) 類似構造間（系統的に炭素鎖長の異なる脂肪酸）での相互作用を定量化したところ、混合物を構成する成分の構造類似性（炭素数もしくは分子量の類似性）や成分濃度が相互作用に影響することが明らかになった。また閾下濃度域で相乗効果、閾上濃度域で抑制効果が確認された。
- 2) 非類似構造間（脂肪酸およびコーヒー香氣成分）での相互作用を定量化したところ、非類似構造間においても相互作用が生じることが明らかになった。また閾下濃度の短鎖脂肪酸による相乗効果が確認された。
- 3) 閾下濃度の短鎖脂肪酸の存在下において、ニオイ識別率およびニオイ強度の増加効果が相乗的であることが確認された。このことからニオイとして知覚できない成分が、相互作用によって他の香氣成分にニオイ寄与を及ぼすことが考えられた。またこの相互作用に化合物依存性は確認されなかった。
- 4) 三成分混合系での相互作用を定量化したところ、相互作用はある規則性に合致した場合にのみ生じることが示唆された。また混合物を構成する成分の構造類似性が低いほど相互作用が生じることが考えられた。

上述の成果は既に6報の国際誌に掲載されており（うち5報が筆頭著者）、新しい手法により解明された評価の高い研究成果となっている。実際に、第41回日本味と匂学会「論文賞」も受賞した（2007年、東京）。よって審査員一同は、本研究者に博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。